

Bimodal imaging of molecular targets associated with plaque vulnerability

Citation for published version (APA):

Prinzen, L. (2009). *Bimodal imaging of molecular targets associated with plaque vulnerability*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090917lp>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090917lp](https://doi.org/10.26481/dis.20090917lp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Aderverkalking is een ziekte die bij bijna iedereen voorkomt, in bepaalde grote bloedvaten door het hele lichaam. Het verloop van de ziekte kan versneld worden door bijvoorbeeld genetische eigenschappen, slechte voeding, of roken. Het is een proces waarbij cholesterol op specifieke plekken in de vaatwand worden gedeponeerd. Deze plekken worden plaques genoemd. Witte bloedcellen (ontstekingscellen) gaan daar actief naar toe om cholesterol te verwijderen. Doordat cholesterol in de vaatwand gedeponeerd blijft worden, kunnen de witte bloedcellen het 'opruimen' van cholesterol niet meer bijhouden en kunnen ze doodgaan. Vervolgens gaat een plaque ontsteken, waarbij er nog meer witte bloedcellen worden aangetrokken vanuit de bloedbaan. Uiteindelijk leidt dit tot de vorming van de 'necrotic core', oftewel een dode kern in de plaque. Door verschillende processen verandert de moleculaire en cellulaire samenstelling van de plaque in de loop van de tijd. Dit kan op den duur leiden tot scheuren van de plaque (plaque-ruptuur). Zo wordt bijvoorbeeld het fibreuse kapsel, een laag bestaande uit voornamelijk collageen die vermoedelijk zorgt voor de stabiliteit van de plaque, dunner door aanwezige enzymen (afkomstig uit onder andere macrofagen). Vele moleculaire en cellulaire processen spelen een rol in plaque-ruptuur; het is nog niet duidelijk welke de belangrijkste is. Bij plaque-ruptuur komt de necrotic core van de plaque in aanraking met de bloedstroom, waardoor bloedstolsels ontstaan en verstoppingen (infarcten) kunnen optreden.

De groei van plaques vindt niet alleen plaats naar binnen toe (bloedvat-vernauwend), maar kan ook naar buiten toe plaats vinden, waarbij het bloedvat niet vernauwd wordt. Dit heeft tot gevolg dat niet alle plaques zichtbaar zijn bij angiografie, waarbij de bloedstroom in de bloedvaten zichtbaar gemaakt wordt. Bovendien zijn er moleculaire en cellulaire verschillen tussen plaques die stabiel zijn en instabiele plaques die mogelijk wel scheuren en daardoor infarcten kunnen veroorzaken. Het is dan ook van belang dat de mogelijk gevaarlijke plaques op een eenduidige manier zichtbaar gemaakt kunnen worden. Wanneer de specifieke moleculaire kenmerken van een instabiele plaque zichtbaar gemaakt kunnen worden zou het dus mogelijk moeten zijn om onderscheid te maken tussen de stabiele en instabiele plaques. Het zichtbaar maken van moleculaire

kenmerken door nanodeeltjes (deeltjes in de grootte orde van een miljoenste van een millimeter) heet 'Molecular Imaging'. In dit proefschrift is het vermogen van verschillende nanodeeltjes onderzocht om, op basis van molecular imaging, instabiele plaques zichtbaar te maken. Er is gekeken naar drie verschillende plaque-componenten: dode cellen, collageen en geactiveerde bloedplaatjes (die in bloedstolsels voorkomen). Hiervoor zijn, naast *in vitro* systemen (zoals celculturen) ook *in vivo* (levende) muismodellen van atherosclerose en bloedstolselvorming gebruikt. Verder zijn twee verschillende beeldvormingstechnieken gebruikt: fluorescentie microscopie vanwege de mogelijkheid om details van cellen te bekijken, en magnetic resonance imaging (MRI) vanwege de klinische toepasbaarheid en de mogelijkheid om van buitenaf bloedvaten te bekijken.

In **hoofdstuk 2** wordt eerst de algemene cellulaire samenstelling van de vaatwand behandeld, waarbij aandacht wordt besteed aan een aantal eigenschappen van instabiele plaques. De vorming van aderverkalking in muizen wordt apart besproken, omdat deze nogal verschilt van aderverkalking bij mensen. Vervolgens worden de essentiële elementen van de gebruikte microscopische techniek (twee-foton laser scanning microscopie; TPLSM) besproken. Als laatste worden de praktische kanten met betrekking tot het met TPLSM waarnemen van plaques in muizen-halsslagaders behandeld.

Hoofdstuk 3 is een literatuuroverzicht van nieuwe nanodeeltjes die gebruikt kunnen worden bij optische beeldvormingstechnieken, toegepast op instabiele atherosclerotische plaques. De optische kenmerken en mogelijke toxiciteit van quantum dots (dit zijn sterk fluorescerende nanodeeltjes gemaakt van halfgeleider kristallen), en goud-, diamant-, koolstof- en silicadeeltjes worden één voor één besproken. Aangezien microscopie technieken niet eenvoudig klinisch toepasbaar zijn, worden ook mogelijkheden voor klinisch gebruik van optische beeldvormingstechnieken besproken. Endoscopietechnieken, waarbij microscopie mogelijk gemaakt wordt met behulp van optische fibers die een bloedvat ingeschoven kunnen worden, zouden het mogelijk kunnen maken om van binnen uit het bloedvat de vaatwand optisch te bekijken met een hogere resolutie dan met bijvoorbeeld MRI of computed tomography (CT). Deze

technieken kunnen in de toekomst mogelijk bijdragen aan individuele en specifieke behandeling van hart- en vaatziekten.

In **hoofdstuk 4** wordt een nanodeeltje beschreven dat als basis uit een quantum dot bestaat. Dit nanodeeltje is specifiek gericht tegen cellen, die apoptose, ofwel geprogrammeerde celdood, ondergaan. Tijdens apoptose is een specifiek molecuul, fosfatidylserine (PS), aan de buitenkant van de cel aanwezig. PS is niet aanwezig aan de buitenkant van gezonde cellen. PS is verder ook zichtbaar aan de buitenkant van geactiveerde bloedplaatjes, die in bloedstolsels voorkomen. Dit nanodeeltje hecht zich aan PS door middel van Annexine A5 dat aan het nanodeeltje gekoppeld is. Dit molecuul zorgt ervoor dat het nanodeeltje specifiek aan apoptotische cellen en geactiveerde bloedplaatjes bindt. Dit nanodeeltje kan zichtbaar gemaakt worden met twee verschillende beeldvormingstechnieken: fluorescentie microscopie en MRI; dit wordt bimodaliteit genoemd. Het nanodeeltje is fluorescerend dankzij de quantum dot. Aan deze quantum dot is gadolinium gekoppeld, dat ervoor zorgt dat het zichtbaar is met MRI. Voor een verdere versterking van de zichtbaarheid met MRI is gebruik gemaakt van een gadolinium-wedge, een acht-armig molecuul dat het aantal gadolinium-ionen verachtvoudigd. Het resulterende nanodeeltje is getest op een celcultuur in apoptose en op bloedstolsels buiten het dier en bekeken met zowel TPLSM als MRI. Om de fysiologische relevantie beter aan te kunnen tonen is ook een beschadigde muizenhalsslagader na operatieve verwijdering gelabeld met dit nanodeeltje. Ook in dit bloedvat was het nanodeeltje zichtbaar met zowel TPLSM als MRI.

Hoofdstuk 5 beschrijft een *in vivo* studie waarin het nanodeeltje uit hoofdstuk 4 is gebruikt in muizen met aderverkalking. Er zijn twee versies van het nanodeeltje gebruikt: in het eerste geval is het nanodeeltje gekoppeld aan Annexine A5 en bindt het dus aan apoptotische cellen en geactiveerde bloedplaatjes (die beide aanwezig kunnen zijn in instabiele atherosclerotische plaques); in het tweede geval bindt het nanodeeltje aan collageen dankzij het molecuul CNA35. Collageen is aanwezig in zowel stabiele als instabiele plaques. Vermoedelijk is echter collageen in instabiele plaques meer toegankelijk voor het nanodeeltje omdat het endotheel dat erboven ligt meer beschadigd is. TPLSM opnames lieten zien dat beide versies van het nanodeeltje zowel oppervlakkig als in diepere lagen van de plaque binden. Aangezien de nanodeeltjes

alleen in specifieke 'hot-spots' zichtbaar zijn lijkt het erop dat ze alleen de plaque labelen wanneer het endotheel toegankelijk, ofwel beschadigd genoeg is. Deze mate van labeling door quantum dots zou een maat kunnen zijn voor plaque instabiliteit. MRI resultaten lieten alleen voor het CNA35-nanodeeltje een zwak signaal zien; het Annexine A5-nanodeeltje was niet zichtbaar met MRI. Aanvullend onderzoek moet gedaan worden om zichtbaarheid met MRI te optimaliseren. Ook de relatie tussen de mate van plaque labeling door quantum dots en plaque instabiliteit moet nog verder worden uitgezocht.

In **hoofdstuk 6** wordt een ander soort bimodaal nanodeeltje beschreven dat specifiek gericht is op verse bloedstolsels of trombi. Dit is een veel kleiner deeltje, dat α_2 -anti-plasmine gebruikt als bindingsfactor. α_2 -antiplasmine is een molecuul dat op een speciale manier aan het bloedstolsel wordt gekoppeld onder invloed van geactiveerd stollingsfactor XIII. Dit gebeurt alleen in de vroege fase van trombusvorming. Het nanodeeltje was bimodaal vanwege de combinatie van het fluorescerende rhodamine en het MRI-zichtbare gadolinium. Tests met bloedstolsels buiten het lichaam laten zien dat het nanodeeltje specifiek bindt aan een onderdeel van bloedstolsels, fibrine. Bovendien laten deze tests zien dat het nanodeeltje zichtbaar is met zowel MRI als met TPLSM. Dit nanodeeltje is ook *in vivo* getest in een muismodel van acute trombusvorming. Ook hier is aangetoond dat het nanodeeltje gevisualiseerd kan worden specifiek in verse trombi met zowel MRI als TPLSM.

In de algemene discussie in **hoofdstuk 7** worden de vereisten voor het optimaal zichtbaar maken van nieuwe nanodeeltjes besproken. Drie verschillende nanodeeltjes zijn gebruikt in dit proefschrift. Omdat deze verschillend zijn samengesteld hebben ze ook verschillende optische en magnetische resonantie eigenschappen. Bovendien vertonen ze ook verschillend gedrag in levende dieren. Omdat MRI visualisatie van gadolinium moeilijker is dan de weergave van fluorescentie met TPLSM, moet visualisatie met MRI geoptimaliseerd worden. Hiervoor zijn in de algemene discussie vier verschillende eigenschappen genoemd. Dit zijn de beschikbaarheid van het doelmolecuul, de sterkte van binding van het ligand aan het doelmolecuul, de beschikbaarheid van het nanodeeltje, en de grootte van het nanodeeltje wanneer het doelmolecuul onder het endotheel ligt. De verschillende eigenschappen van deze

nanodeeltjes worden vergeleken en de invloed van deze eigenschappen op het resultaat van de experimenten wordt besproken.